AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
VORSTEHER: PROF. DR. R. DOERR

ZUR CHEMIE DER BAKTERIELLEN TOXINE

II. MITTEILUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

KARL KELLENBERGER
AUS OBEREGG (APPENZELL I. RH.)

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1926

Von der medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. R. Doerr.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Veröffentlicht in der „Zeitschrift für Hygiene", Bd. 106.

C. Hallauer hat in einer jüngst erschienenen Mitteilung (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., **105**, 138) das von *Doerr* zuerst beschriebene *Phänomen der Inaktivierung (Entgiftung) bakterieller Toxine durch stark dissoziierte Säuren und ihrer Reaktivierung durch Wiederherstellung der ursprünglichen Wasserstoffionenkonzentration* genauer zu analysieren versucht und gelangte zu dem Schlusse, daß diese merkwürdige Erscheinung höchstwahrscheinlich als ein *chemischer* Prozeß, und zwar als eine *intramolekulare Umlagerung*, zu betrachten sei. Die Bakteriengifte, denen man in Anbetracht ihrer Antigenfunktionen eine *cyclische Atomgruppierung* zuschreiben darf, sind bekanntlich äußerst unbeständige Verbindungen; nimmt man an, daß an dieser Instabilität auch die im Toxinmolekül vorhandenen Ringsysteme partizipieren, so liegt im Hinblick auf die Ergebnisse der neueren Eiweißchemie die Vorstellung nahe, daß die Entgiftung bakterieller Toxine auf einer *Umwandlung der cyclischen in offene Ketten* beruht, und daß umgekehrt die Reaktivierung den physiologischen Ausdruck der Rückverwandlung dieser offenen in ringförmige Atomgruppierungen darstellt. Als wesentlichste Stütze dieser Hypothese führte *Hallauer* die Tatsache an, daß sich bei der Inaktivierung durch Säuren und bei der nachfolgenden Reaktivierung durch Zusatz äquivalenter Alkalimengen nicht nur die Giftigkeit der Toxine (toxischen Bouillonkulturfiltrate) ändert, *sondern daß auch die Antigenfunktion, gemessen an der aktiv immunisierenden Wirkung, eine gleichgerichtete Ab- bzw. Zunahme erkennen läßt*; angesäuerte Lösungen von Dysenterietoxin immunisieren nicht oder doch weit schwächer als die nativen Ausgangsgifte, und nach der Abstumpfung der Säure kehrt gleichzeitig mit der Toxizität auch das Immunisierungsvermögen wieder zurück. Diese Feststellung ist in doppelter Hinsicht von Bedeutung. Zunächst bildet sie eines der Fundamente der von *Hallauer* vertretenen Theorie; daß das Vorhandensein aromatischer Kerne für die biologischen Wirkungsqualitäten notwendig ist, können wir nämlich *nur für die Antigenfunktion* mit größerer Sicherheit behaupten, während uns die chemischen Grundlagen *der Giftigkeit*

bakterieller Toxine vollständig unbekannt sind. Zweitens aber treten die durch Säuren erzielbaren Veränderungen der Toxine eben durch die erwähnte Feststellung in einen bemerkenswerten *Gegensatz zu einer anderen Gruppe von chemischen Toxinmodifikationen*, deren gemeinsames Kriterium darin zu sehen ist, daß sich ein *irreversibler* Verlust der Toxizität mit dem *Erhaltenbleiben der Antigenfunktion* kombiniert. Toxinderivate der letztgenannten Art, welche man als *Toxoide* oder *Atoxine* (*S. Fränkel, Ramon*) zu bezeichnen pflegt, und die für die Frage der aktiven antitoxischen Schutzimpfungen praktische Wichtigkeit besitzen, lassen sich durch die verschiedensten Agenzien (Jod, Formaldehyd, längere Lagerung usw.) darstellen; ihre Existenz hat zu der Ansicht geführt, daß die chemischen Träger der Toxizität und der Antigenfunktion im Toxinmolekül verschieden und voneinander weitgehend unabhängig sind, da es so leicht gelingt, die Giftwirkung auszulöschen, ohne die immunisatorischen Eigenschaften zu zerstören. Man hat sogar die Möglichkeit erwogen, daß die Toxine keine einheitlichen Verbindungen im Sinne der organischen Chemie repräsentieren, die in ihrem komplizierten Molekül zwei verschiedene biologisch aktive Atomgruppierungen (die „toxophore" und die „haptophore" nach der *Ehrlich*schen Terminologie) enthalten, *sondern daß einfach ein giftiger, nichtantigener Stoff mit einem atoxischen antigenen Protein* (im nativen Toxin) *in rein adsorptiver Weise gekuppelt ist*; die Substanzen, welche wir Toxine nennen, wären somit Komplexe, deren beide Komponenten nicht durch einen molekularen Verband, sondern durch physikalische Affinitäten aneinander gekettet erscheinen (vgl. *H. Gideon Wells*, The chemical aspects of immunity, 1925, S. 43). Diese Auffassung ist jedoch unseres Erachtens nicht haltbar; akzeptiert man dieselbe, so wird es unverständlich, warum der nach Zerstörung des giftigen Bestandteiles verbleibende Rest im Organismus Antikörper produziert, welche eben diesen toxischen Anteil zu neutralisieren vermögen. Man darf sich hier keineswegs auf das Beispiel der *Lipoide* berufen. Es ist allerdings durch die Untersuchungen von *Landsteiner*, *Sachs*, *Doerr* und ihren Mitarbeitern bewiesen worden, daß Lipoide die ihnen fehlende immunisatorische Fähigkeit erwerben, wenn man sie mit Eiweißantigenen kombiniert, und die Experimente von *Doerr* und *C. Hallauer* haben es sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Verbindung von Lipoid und Protein, die dabei zustande kommt, nicht chemischer, sondern *physikalischer* Natur ist. Aber gerade diese Verhältnisse lassen sich auf die Toxine bei näherem Zusehen nicht übertragen. Nach parenteraler Zufuhr der Lipoideiweißgemenge entstehen nicht ein einziger, sondern *zwei* Antikörper, die in den betreffenden Immunsera unabhängig voneinander koexistieren, und von denen der eine spezifisch auf das Lipoid, der andere auf das Protein eingestellt ist (*Doerr* und *C. Hallauer*). Der Fall

liegt somit offenbar ganz anders wie bei den chemischen Trägern der Toxizität und der Antigenfunktion der bakteriellen Gifte; hier werden wir den Tatsachen am besten gerecht, wenn wir die nativen Toxine als *chemische Individuen* betrachten, die so aufgebaut sind, *daß Toxizität und Antigenfunktion zwar durch besondere, aber in einem Molekül vereinte Atomgruppierungen bedingt erscheinen.* Die Begründung dieser auf *P. Ehrlich* zurückdatierenden Theorie müßte zweifellos an Sicherheit gewinnen, wenn es gelänge, ein Agens ausfindig ausfindig zu machen, das beide Wirkungsqualitäten der Toxine in gleicher Richtung beeinflußt, ohne sie jedoch definitiv aufzuheben; die letzte Forderung muß gestellt werden, da es sich ja sonst um eine vollständige Zerstörung bzw. Aufsplitterung des Toxinmoleküls handeln könnte. Es ist ohne weiteres klar, daß die Beobachtungen von *C. Hallauer* diese Lücke ausfüllen; durch Säuren wird — wie oben betont — nicht nur die Giftigkeit, sondern auch das Immunisierungsvermögen der Toxine ausgelöscht bzw. stark reduziert, und dieser Effekt kann nicht auf einer Zertrümmerung des Toxinmoleküls beruhen, da sonst die Regeneration der ursprünglichen biologischen Aktivitäten durch Neutralisation der Säure ausgeschlossen wäre.

Die beiden vorstehend diskutierten hypothetischen Prämissen (Einheitlichkeit des Toxinmoleküls, Bildung der unwirksamen, aber reversiblen Toxinderivate durch intramolekulare Umlagerung) gestatten aber noch eine weitere, experimentell verifizierbare Ableitung; sollen sie nämlich richtig sein, so müßten die zwei Wirkungsqualitäten der nativen Toxine bei der Inaktivierung durch Säuren und bei der Reaktivierung durch Alkali nicht nur *gleichsinnig*, sondern auch *gleichmäßig* verändert werden, d. h. es müßte zwischen ihnen in allen Phasen des Vorganges *ein quantitativer Parallelismus* bestehen. Wenn also z. B. die tödliche Minimaldosis einer Dysenteriegiftlösung nach dem Zusatze von Salzsäure auf das 100fache ihres ursprünglichen Wertes ansteigt, so sollte auch die Dosis immunisans minima um denselben Betrag zunehmen; das gleiche hätte mutatis mutandis für die Ergebnisse der Titrierung der durch Alkali regenerierten Giftlösung zu gelten. Vollzieht sich der fragliche Übergang der Ringsysteme in offene Ketten in je 99 von 100 identisch konfigurierten Toxinmolekülen, und führt dieser Prozeß de facto zum (reversiblen) Verlust *beider* Wirkungsqualitäten, so ist ein anderes Versuchsresultat gar nicht zu erwarten. *C. Hallauer* hat zwar darauf hingewiesen, daß ein quantitativer Parallelismus der bezeichneten Art im Sinne der von ihm aufgestellten Hypothese eine Notwendigkeit darstellt, konnte sich jedoch aus äußeren Gründen nicht mit der experimentellen Prüfung dieser Angelegenheit befassen. Es erschien daher zunächst von Interesse, in der gedachten Richtung ergänzende Versuche anzustellen.

I.

Die Ausführung der betreffenden Experimente stieß auf erhebliche Schwierigkeiten. Schon die annähernd sichere Ermittelung einer tödlichen *Minimaldosis* ist für toxische Dysenteriebouillonkulturfiltrate kaum möglich; indes kann man sich hier so helfen, daß man statt der Dosis minima *die Dosis certe letalis* als Maßstab bzw. als Maßeinheit wählt (*Doerr, R. Zangger, Zdansky* und *B. M. Herzog, O'Brien* und seine Mitarbeiter). Die titrierende Bestimmung der Dosis immunisans minima läßt sich dagegen nicht auf diesem Wege erledigen und hat mit Umständen zu kämpfen, die in der Natur der Fragestellung begründet sind. Man kann die Tiere (Kaninchen) mit den auf ihre aktiv immunisierende Wirkung zu untersuchenden, sehr kleinen Dosen der Giftlösungen nur *ein einziges Mal* injizieren, und es ist bekannt, daß sich nach solchen einmaligen Einspritzungen minimaler Antigenmengen nur eine geringgradige antitoxische Immunität entwickelt, die überdies erst *nach einer langen Inkubationsperiode* in Erscheinung tritt. Ein Teil der Kaninchen geht zugrunde, bevor noch ihr Immunitätszustand untersucht werden kann; und bei den überlebenden darf man die Prüfungsdosis nicht zu hoch bemessen, da sonst eine tatsächlich vorhandene, aber nur *partielle* Immunität ganz verdeckt wird. Nach mehrfachen vergeblichen Bemühungen ist es indes doch geglückt, diese Hindernisse zu überwinden, wie die folgenden Tabellen erkennen lassen.

A. **Natives Toxin „α"** (22tägige Bouillonkultur des Shiga-Kruse-Stammes „Dys. A", filtriert durch Reichelkerzen; p_H des Filtrates = 7,6, elektrometrisch und mit Farbindicatoren bestimmt).

α) *Toxizität* (intravenöse Injektion steigender Dosen bei Kaninchen von 1500 g Lebendgewicht):

Dosis:	Resultat:
0,0005 ccm	0
0,001 „	0
0,01 „	0
0,025 „	0
0,05 „	0
0,05 „	† (bedeutet Exitus des Versuchstieres innerhalb weniger Tage)
0,05 „	0
0,05 „	0
0,05 „	0
0,07 „	Lähmungen, erholt sich, überlebt.
0,07 „	†
0,07 „	†
0,07 „	†
0,07 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†
0,1 „	†

Als **Dosis certe letalis** hatte sich somit **0,1 ccm** ergeben.

β) Immunisierende Wirkung. (Kaninchen von 1500 g wurden mit steigenden Dosen des nativen Toxins intravenös vorbehandelt und nach 30 Tagen mit der knapp letalen Dosis derselben Giftlösung, nämlich mit 0,07 ccm iv. reinjiziert):

Immunisiert mit Toxin α:	Reinjiziert nach 30 Tagen mit 0,07 ccm derselben Giftlösung:
0,005 ccm	†
0,001 „	†
0,005 „	Immun
0,01 „	„
0,025 „	„
0,05 „	„
0,05 „	„
0,05 „	„

Die **Dosis immunisans minima** betrug also für das native Toxin **0,005 ccm.**

B. **Angesäuertes Toxin** (4,5 ccm natives Toxin + 14,9 ccm physiologische NaCl-Lösung + 0,6 ccm n-HCl; $p_H = 2{,}45$):

α) Toxizität[1]*:*

0,1 ccm	0
0,25 „	0
0,5 „	0
1,0 „	0

β) Immunisierungsvermögen:

Dosis immunisans:	Ergebnis der Reinjektion mit 0,07 ccm nativen Toxins:
0,1 ccm	†
0,25 „	†
0,5 „	†
1,0 „	Immun

C. **Regeneriertes Toxin** (10 ccm der obigen angesäuerten Lösung + 0,3 ccm n-NaOH):

α) Toxizität:

0,005 ccm	0
0,01 „	0
0,025 „	0
0,05 „	0
0,1 „	0
0,5 „	†
0,5 „	†

β) Immunisierungsvermögen:

0,001 ccm	†
0,005 „	†
0,01 „	†
0,025 „	Immun
0,05 „	„
0,05 „	„
0,1 „	„

[1]) Hier wie in allen folgenden Versuchen mit angesäuerten, regenerierten oder verdünnten Giftlösungen werden als injizierte Dosen diejenigen Mengen des *nativen Toxins* angegeben, welche rechnungsgemäß im eingespritzten Volum der betreffenden Lösung vorhanden sein mußten.

Das Resultat läßt sich daher in folgende Proportionen zusammenfassen:

Die *sicher tödlichen Dosen* der nativen, der angesäuerten und der regenerierten Toxinlösung verhielten sich wie: 0,1 ccm : ? (> 1,0 ccm) : 0,5 ccm, die Toxizitäten, d. h. die reziproken Werte, wie **200 : ? : 40.**

Die *immunisierenden Minimaldosen* verhielten sich wie 0,005 ccm : 1 ccm : 0,025 ccm, die reziproken Intensitäten der aktiv immunisierenden Wirkung wie **200 : 1 : 40.**

Die Übereinstimmung mit der Erwartung war sonach eine auffallend gute, und es ist nicht anzunehmen, daß die Interpolation von Zwischenwerten in den Titrationsreihen dieses befriedigende Ergebnis wesentlich modifiziert haben würde. Daß die saure Lösung in den geprüften Dosen überhaupt nicht tödlich wirkte, paßt sich ganz in den Rahmen des Experimentes ein; die letale Dosis hätte weit mehr als einen Kubikzentimeter (rechnungsgemäß 20 ccm) betragen müssen, Quanten, die man wegen des hohen Gehaltes an freier Säure nicht mehr in die Ohrvene der Kaninchen injizieren kann, ohne die Tiere unmittelbar zu gefährden.

Es sei jedoch ausdrücklich betont, daß Wiederholungen des hier mitgeteilten Versuches mit anderen Giftlösungen oder mit anderen Säurekonzentrationen keinen *zahlenmäßig* nachweisbaren quantitativen Parallelismus erkennen ließen, sondern daß sich die Abschwächungen bzw. Regenerationen der Toxizität und der Antigenfunktion *nur im allgemeinen* innerhalb derselben Grenzen bewegten. Insbesondere ergaben sich Differenzen bei den Auswertungen der sauren Toxine, während die regenerierten (alkalisierten) Toxine weit häufiger die nach der Theorie zu fordernden Ergebnisse lieferten. Es ist das aus mehrfachen Gründen verständlich:

1. Haften den Titrationsmethoden mehrfache Fehlerquellen an, die in den verschiedenen und teilweise zu großen Intervallen zwischen den auf Toxizität und Immunisierungsvermögen zu prüfenden Dosen der Giftlösungen liegen. Der Unterschied zwischen 0,001 und 0,005 ccm ist z. B. weit größer als der zwischen 0,025 und 0,05 ccm. Ein Ausgleich der dadurch bedingten Unregelmäßigkeiten durch feiner und gleichmäßig abgestufte Dosen hätte aber ein Tiermaterial erfordert, über welches wir zur Zeit nicht verfügen. Aus demselben Grunde war es uns auch nicht möglich, den Einfluß der individuellen Beschaffenheit der Versuchstiere (Kaninchen), der gerade beim Dysenterietoxin eine große Rolle spielt, dadurch auszuschalten, daß jede einzelne Dosis einer genügend großen Zahl von Kaninchen (nach *O'Brien* mindestens 4) eingespritzt worden wäre.

2. Erhellt aus den Untersuchungen von *C. Hallauer*, daß sich verschiedene Lösungen eines identischen, d. h. *mit demselben Stamm von*

Dysenteriebacillen hergestellten Toxins, gegen die Einwirkung von Säure bzw. gegen die nachfolgende Reaktivierung durch Alkali *verschieden* verhalten. Nach *C. Hallauer* existieren in dieser Beziehung 3 gut charakterisierbare Reaktionstypen, und zwar

a) *Bouillonkulturfiltrate von hoher primärer Toxizität*, die unter dem Einfluß eines p_H von ca. 2,5 ihre Giftigkeit zum Teil beibehalten; die Regeneration ist hier eine vollständige oder annähernd vollständige;

b) *Mittelstarke Gifte*, die im angesäuerten Zustande ihre Toxizität und ihr antigenes Vermögen anscheinend völlig verlieren; die Reaktivierung bringt beide Leistungsqualitäten wieder zum Vorschein, allerdings mit einem deutlich ausgeprägten Verlust.

c) *Schwache Gifte*, die durch Säuren unwirksam werden, die sich aber durch Alkali nicht mehr regenerieren lassen.

Es ist klar, daß sich nur Toxine vom Typus a zu Versuchen eignen werden, welche über den quantitativen Parallelismus Aufschluß bieten sollen; das verwendete Bouillonkulturfiltrat „Toxin α" gehörte in der Tat in diese Gruppe.

In Anbetracht dieser Umstände schien uns das oben wiedergegebene vielgliedrige Experiment im Vereine mit den qualitativen Prüfungen, die bereits *C. Hallauer* ausgeführt hat, genügend, um die Frage, welche der Versuchsanordnung zugrunde gelegt wurde, zu bejahen, d. h. um die Theorie von der Zugehörigkeit der toxischen und antigenen Atomgruppierungen zu einem einzigen Molekularverband und die Hypothese von der durch Säure bewirkten intramolekularen Umlagerung durch ein neues Argument zu erhärten.

II.

Für das im vorigen Abschnitt erwähnte differente Verhalten verschiedener Dysenterietoxine (Bouillonkulturfiltrate), die mit demselben Stamm Shigascher Bacillen hergestellt werden, konnte *C. Hallauer* keine Erklärung geben. Es konnte nur gezeigt werden, *daß der Toxingehalt der giftigen Filtrate bzw. das Verhältnis zwischen der im Reaktionsvolum vorhandenen Toxinmenge und dem zugesetzten Säurequantum nicht maßgebend ist*, da die Säure immer im Überschuß zur Anwendung gelangte, und da es auch nicht möglich war, den Reaktionstypus einer bestimmten Giftlösung durch Variierung der zugefügten Säuremengen in einen beliebigen anderen Typus überzuführen. Wir haben daher Toxine, welche nachweislich den 3 Reaktionstypen angehörten, miteinander verglichen, um abgesehen vom Toxingehalt noch *irgendwelche andere Eigenschaften* ausfindig zu machen, die zu dem verschiedenen Verhalten gegen Säuren in Beziehung gebracht werden könnten. Hierbei stellte sich heraus, daß die zur Gruppe a zählenden Toxine „α" und „γ" aus Bouillonkulturen (durch Filtration) gewonnen worden waren, die nach der Beimpfung

22 Tage im Thermostaten (37° C) gestanden hatten; Toxin „Toba I" (Gruppe b) stammte aus einer *11tägigen* und Toxin „Toba VIII" (Gruppe c) aus einer *5tägigen* Bouillonkultur. *Das Alter der toxischen Bouillonkultur schien sonach auf den Reaktionstypus Einfluß zu besitzen*; da mit dem Alter in der Regel auch die Giftigkeit der Kulturen bzw. der aus denselben dargestellten Filtrate zunimmt, wurde es verständlich, daß zunächst eine Abhängigkeit des Reaktionstypus vom Grade der primären Toxizität vorgetäuscht werden konnte, eine Annahme, die sich jedoch bei der experimentellen Prüfung — wie erwähnt — nicht bestätigte.

In der alternden Bouillonkultur sterben die Dysenteriebacillen ab und verfallen der Autolyse. Es gehen auf diese Weise Leibessubstanzen in Lösung, die auch in den Filtraten vorhanden sein müssen. Man könnte daher auf den Gedanken verfallen, daß diese Leibessubstanzen die Reaktion zwischen dem eigentlichen Toxin und der Säure auf irgendeine Art hemmen, oder daß sie selbst toxisch sind, aber mit der Säure anders als die in der jungen Kultur auftretenden, löslichen Gifte reagieren. Bei den Shiga-Kruseschen Bacillen hat man ja seit jeher zwischen *sezerniertem Exotoxin* und *an die Bakterienzelle gebundenem Endotoxin* unterscheiden wollen, und *Olitsky* und *Kligler* schrieben diesen beiden hypothetischen Arten des Dysenteriegiftes sogar verschiedene Wirkungen zu, dem Exotoxin eine neurotrope, dem Endotoxin eine enterotrope Affinität.

Nun wissen wir aber, daß schon ganz junge, 24stündige Agarkulturen von Shiga-Kruseschen Bacillen hochtoxisch sind, und daß große Kaninchen von 2—3 kg unter *Lähmungserscheinungen* und *schweren Darmläsionen* akut eingehen, wenn man ihnen $^1/_{10}$—$^1/_{50}$ Öse einer solchen Kultur, in NaCl-Lösung suspendiert, subcutan einspritzt. Eine Vermehrung der injizierten Bakterien im Kaninchenorganismus tritt nicht ein (*Doerr*); übrigens wirkt eine (bei 56° C) abgetötete Bakteriensuspension in denselben Mengen wie die gleiche Aufschwemmung im nichtsterilisierten Zustande. Sezernierte (nach außen abgesonderte) Toxine können an dem Effekt nicht beteiligt sein, wie die Prüfung gleichaltriger Bouillonkulturen bzw. ihrer bakterienfreien Filtrate lehrt; es kommen also nur die in den Bakterienleibern selbst enthaltenen Gifte in Betracht, und diese affizieren das Nervensystem ebensowohl wie die Darmmucosa. *Doerr* hat schon in seiner ersten Publikation den Beweis erbracht, daß die Inaktivierung durch Säuren und die nachfolgende Regeneration durch Alkali nicht nur mit gelöstem Dysenteriegift (Bouillonkultur-Filtrat), sondern auch mit toxischen Bakteriensuspensionen gelingt. Bei wiederholten Nachprüfungen bekamen wir jedoch inkonstante Resultate, indem die Entgiftung durch Säure ausblieb, ohne daß wir in der Lage waren, irgendeine Ursache für das verschiedene Ver-

halten anscheinend ganz gleichartiger Suspensionen von Bacillen desselben Stammes zu ermitteln. Auf den Faktor des *Alters der Kultur* durch die Erfahrungen mit Bouillonkulturfiltraten aufmerksam gemacht, gingen wir daran, die Bedeutung dieses Momentes für die Agarkulturen zu untersuchen und fanden hier zum Teile ähnliche Verhältnisse.

A. **24stündige Agarkulturen** des Stammes „Dys. A", in NaCl-Lösung aufgeschwemmt und *sofort* zum Versuche verwendet:

1. *Toxizität der Suspension im nativen Zustande:*

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	θ
0,05 „ „	† in 8 Tagen
0,1 „ „	† „ 6 „
0,25 „ „	† „ 2 „
0,5 „ „	† „ 2 „
1,0 „ „	† „ 1 „

2. *24 ccm derselben Suspension + 6 ccm n-HCl:*

0,1 ccm iv.	θ
0,25 „ „	θ
0,5 „ „	θ
1,0 „ „	θ

3. *10 ccm der sauren Suspension + 2 ccm n-NaOH:*

0,05 ccm iv.	† in 7 Tagen
0,1 „ „	† „ 5 „
0,25 „ „	† „ 2 „
0,5 „ „	† „ 2 „
1,0 „ „	† „ 1 „

B. **5tägige Agarkulturen,** aufgeschwemmt in NaCl-Lösung; die Suspensionen bleiben **weitere 5 Tage** bei 20° C stehen und werden dann verwendet:

1. *Toxizität der nativen Suspension:*

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	θ
0,05 „ „	† in 2 Tagen
0,1 „ „	† „ 7 „
0,25 „ „	† „ 2 „

2. *24 ccm dieser Suspension + 6 ccm n-HCl:*

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	Lähmungen, überlebt
0,5 „ „	† in 4 Tagen
1,0 „ „	† „ 1 „

3. *10 ccm der angesäuerten Suspension + 2 ccm n-NaOH:*

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	† in 2 Tagen
0,5 „ „	† „ 2 „

Obwohl somit die junge Agarkultur dieselbe Toxizität besaß wie die gealterte, verlief die Inaktivierung durch Säure bei beiden in verschie-

dener Weise: *Die junge Kultur wurde vollständig entgiftet, bei der gealterten gelang die Entgiftung nur partiell.*

Worin besteht nun der Unterschied zwischen jungen und alten Kulturen einer und derselben Bakterienrasse? Im allgemeinen herrscht auch heute noch die Auffassung, daß in den alten Kulturen eine größere Anzahl abgestorbener Bakterien vorhanden ist, und daß in der die Mikrobenzellen umgebenden Nährflüssigkeit verschiedene ursprünglich fehlende Stoffe auftreten, die aus dem Zerfall der toten Bakterien stammen, daß aber die lebenden Elementarorganismen hinsichtlich ihrer Funktionen den lebenden Exemplaren in jungen Kulturen gleichgesetzt werden müssen. Würde diese Ansicht den Tatsachen entsprechen, dann müßte auch die individuelle Lebensdauer bzw. die Generationsdauer der Bakterien in der jungen wie in der alten Kultur dieselbe sein, eine Annahme, die offenbar wirklich gemacht wird, wenn man von „Bakterienpopulationen" spricht und die Geschehnisse in einem solchen Bakterienvolk mit den Vorgängen in Völkern höherer Organismen z. B. in der menschlichen Bevölkerung vergleicht, wo die Individuenzahl durch das gegenseitige Verhältnis der Vermehrungsintensität und Absterbeintensität bei gleichbleibender durchschnittlicher Lebensdauer reguliert wird. Diese Vorstellung dürfte indes kaum einer eingehenderen experimentellen Untersuchung standhalten, die wir uns vorläufig noch vorbehalten möchten. Einstweilen können wir nur auf Grund des makroskopischen Verhaltens der Agarkulturen sagen, daß in diesen die Vermehrungsvorgänge nach 24—48 Stunden ganz sistieren, da keine weitere Massenzunahme des Kulturrasens erfolgt, was unbedingt der Fall sein müßte, wenn sich bei fortschreitender Proliferation immer neue Bakterienkadaver oder Zerfallsprodukte derselben anhäufen würden; auch ist ja die Toxizität der alten Agarkultur dieselbe wie jene der jungen (in den obigen Experimenten wurden gleiche Bakterienmassen in gleichen Mengen physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt!), was vom Standpunkt einer fortschreitenden Vermehrung gleichfalls unverständlich bliebe, da sowohl lebende als auch abgetötete und autolysierte Dysenteriebacillen giftig sind. In Bouillonkulturen sind die Vorgänge natürlich weit weniger durchsichtig und weichen auch erheblich von den Vorgängen in Agarkulturen ab, da die Majorität der Bakterienzellen der ausgiebigen Einwirkung des Luft-O entzogen ist, einem für die Toxinproduktion der Dysenteriebacillen sehr wichtigen Faktor (*Doerr*, *Hirschfeld*). Hier erscheint es aber wieder auffällig, daß die Giftigkeit der Bouillonvollkulturen (d. h. der Bouillonkulturen im unfiltrierten Zustande) während der ersten Tage oder sogar Wochen, also zur Zeit der stärksten Bakterienvermehrung, so gering bleibt und erst in der gealterten Kultur, nach Sistierung der Proliferation, oft plötzlich auf das 100—1000fache ansteigt. Man dürfte kaum fehlgehen, *wenn*

man den lebenden Mikroben in der alten Kultur eine andere, und zwar eine weit höhere Lebensdauer und einen anderen Stoffwechsel zuschreibt. Die (mit dem Toxin nicht identischen!) Produkte des Stoffwechsels der Bakterien in solchen gealterten Kulturen scheinen nun die Reaktion zwischen Toxin und Säure zu modifizieren.

Das „Toxin γ" war ein Bouillonkulturfiltrat, gewonnen aus einer Bouillonkultur des Stammes „Dys. A", welche **22 Tage** im Thermostaten gestanden hatte. Das Filtrat hatte den $p_H = 8$ und besaß folgende Toxizität:

0,005 ccm iv.	θ
0,01 „ „	θ
0,025 „ „	† in 2 Tagen
0,05 „ „	† „ 2 „
0,1 „ „	† „ 2 „
0,25 „ „	† „ 1 „

1. In einer *ersten Versuchsreihe* wurde das **konzentrierte** Toxin mit n-HCl versetzt, bis der p_H auf 2,4 anstieg. Die Toxizität betrug nunmehr:

0,05 ccm iv.	θ
0,1 „ „	θ
0,25 „ „	† in 5 Tagen
0,5 „ „	† „ 4 „
1,0 „ „	† „ 3 „

Nach der Wiederherstellung eines p_H von 8 belief sich die Giftigkeit auf:

0,01 ccm iv.	θ
0,025 „ „	† in 10 Tagen
0,05 „ „	† „ 3 „
0,1 „ „	† „ 4 „
0,25 „ „	† „ 1 „

2. In der zweiten Versuchsreihe wurden 8 ccm des konzentrierten Toxins **mit 24 ccm NaCl verdünnt** und zu der Verdünnung so viel n-HCl zugesetzt, daß der $p_H = 2{,}7$ betrug; die H-Ionenkonzentration war daher noch etwas geringer als in der ersten Versuchsreihe. Die Giftigkeit der angesäuerten und der wieder neutralisierten Lösung ergab aber bei der Titration ganz andere Werte:

Angesäuert:		Regeneriert:
0,025 ccm iv.	θ	θ
0,05 „ „	θ	† in 4 Tagen
0,1 „ „	θ	† „ 1 „
0,25 „ „	θ	† „ 2 „
0,5 „ „	θ	† „ 2 „
1,0 „ „	θ	

Am ehesten läßt sich diese Differenz erklären, wenn man annimmt, daß die in der gealterten Kultur vorhandenen und die Reaktion zwischen Säure und Toxin hemmenden Stoffe durch die Verdünnung eine Konzentrationsabnahme erfahren haben, so daß die Entgiftung in der zweiten Versuchsreihe eine vollständigere wurde, obwohl die einwirkende H-Ionenkonzentration nicht einmal so groß war wie bei dem konzentrierten Filtrat. Gewißheit ließe sich allerdings erst durch Wiederholung der Experimente mit auf verschiedenen Wegen gereinigten Toxinen und mit gewaschenen Dysenteriebacillen erzielen.

Zusammenfassung.

1. Toxizität und Antigenfunktion (aktiv immunisierende Wirkung) nehmen in quantitativ gleichem Ausmaße ab, wenn man Dysenterietoxin unter geeigneten Bedingungen mit HCl versetzt. Dieser quantitative Parallelismus tritt auch zutage, wenn man die angesäuerten Giftlösungen durch Abstumpfung der Säure (Zusatz von Alkali) wieder reaktiviert. Diese Erscheinung spricht für die Annahme, daß die chemischen Träger der beiden biologischen Wirkungsqualitäten des Dysenterietoxins Atomgruppierungen darstellen, die in einem Molekül miteinander vereinigt sind.

2. Die Reaktion zwischen Toxin und Säure verläuft je nach dem Alter der Kulturen (Bouillon- oder Agarkulturen), aus welchen das Toxin dargestellt wird, unter sonst gleichen Bedingungen verschieden. Es wird erörtert, auf welche Weise diese Differenz mit den verschiedenen Stoffwechselprozessen der Bakterien in alten und jungen Kulturen zusammenhängen könnte.

Literaturverzeichnis.

Hallauer, C., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **105**, 138. — *Olitzki* und *Kligler*, Journ. of exp. med. 1920. — *Zangger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **101**, 39. — *Zdansky* und *B. M. Herzog*, Ebenda **102**, 352. — *Doerr*, Rapports sur les recherches sérologiques. Société des Nations 1923.